

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Barbora Pospíšilová

Úloha sfingosinkinázy v kardioprotekci

The role of sphingosin kinase in cardioprotection

Bakalářská práce

Školitel: Doc. RNDr. Olga Nováková, CSc.

Praha 2015

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Olze Novákové, CSc. za odbornou konzultaci, cenné rady a trpělivost. Poděkování také patří mé rodině, která mě po celou dobu podporovala.

Prohlášení: Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně z uvedené literatury.

Praha 14. 5. 2015

Barbora Pospíšilová

Obsah

1	Abstrakt	
2	Seznam použitých zkratk	
3	Úvod	1
4	Metabolismus sfingolipidů	2
4.1.	Struktura sfingolipidů.....	2
4.2.	Syntéza sfingolipidů.....	2
4.3.	Katabolismus sfingolipidů.....	3
5	Sfingolipidové signální molekuly.....	5
5.1.	Ceramid.....	5
5.2.	Sfingosin.....	6
5.3.	Sfingosin-1-fosfát.....	6
5.4.	Ceramid-1-fosfát.....	7
6	Sfingosinkinázy.....	7
6.1.	Struktura a funkce sfingosinkinázy 1 a sfingosinkinázy 2.....	8
6.2.	Úloha sfingosin-1-fosfátu v endogenní kardioprotekci.....	9
6.2.1.	Receptory sfingosin-1-fosfátu.....	10
6.2.2.	Kardioprotektivní účinek sfingosin-1-fosfátu.....	12
6.2.3.	Aktivátory a inhibitory sfingosinkinázy 1.....	14
6.3.	Důkazy potvrzující protektivní účinky sfingosinkinázy 1.....	14
6.4.	Důkazy potvrzující protektivní účinky sfingosinkinázy 2.....	15
6.5.	Sfingosin-1-fosfát jako součást protektivního účinku HDL.....	17
7	Využití syntetických agonistů a antagonistů receptorů pro sfingosin-1-fosfátu v klinické praxi.....	18
7.1.	Agonisté sfingosin-1-fosfátu.....	18
7.2.	Antagonisté sfingosin-1-fosfátu.....	19
8	Závěr.....	21
9	Použitá literatura.....	23

1. Abstrakt

Sfingosin-1-fosfát (S1P) je bioaktivní mediátor s kardioprotektivním účinkem. Jeho vznik je katalyzovaný enzymem sfingosinkinázou (SK). Ta se vyskytuje ve dvou izoformách sfingosinkináza 1 a 2. Přestože SK1 má antiapoptické vlastnosti a SK2 proapoptické, obě jsou nedílnou součástí působení S1P ve tkáních. S1P je schopen ovlivňovat osud buňky intracelulárně nebo extracelulárně. Extracelulární působení vede přes S1P receptory umístěné na plazmatické membráně buněk. V srdeční tkáni se vyskytují tři z pěti S1P receptorů spřažených s G-proteiny (S1P₁, S1P₂, S1P₃). Navázáním S1P na tyto receptory dochází ke spuštění sledu reakcí vedoucích ke kardioprotekci. Pokusy se S1P přidaným do média s kardiomyocyty potvrdily, že zvyšuje jejich přežití. S1P redukuje rozsah infarktu u myokardu vystaveného ischemii a reperfúzi. Za podmínek ischemického preconditioningu (IPC) a postconditioningu (IPOST), kde se jedná o krátké periody ischemie aplikované před nebo po hlavní ischemii, dochází vzhledem k uvolnění S1P ke zvýšení přežití buněk a rychlejší obnově hemodynamické funkce v srdeční tkáni. Účinky S1P a jeho role v kardioprotekci jsou zkoumány na modelových organismech především myších. Důkazem kardioprotektivního účinku S1P byly experimenty s využitím knock-out (KO) genů, kde došlo k eliminaci kardioprotektivního účinku IPC a IPOST v myších srdcích. Ke studiu funkce S1P se využívají různé druhy agonistů a antagonistů S1P receptorů jako FTY720, které se používají ke zkoumání účinků S1P a některé z nich již mají své uplatnění v klinické praxi.

Klíčová slova: kardioprotekce, lipidová signalizace, sfingolipidy, sfingosinkináza, sfingosin-1-fosfát, ischemický preconditioning, ischemický postconditioning

Abstract

Sphingosine-1-phosphate (S1P) is bioactive mediator with cardioprotective effect. Sphingosine kinase (SK) is a key enzyme in the synthesis of S1P. It exists in the two isoforms sphingosine kinase 1 and sphingosine kinase 2. Although SK1 has antiapoptotic feature and SK2 has proapoptotic feature both are crucial for the effect of S1P. S1P can act and affect the cellular fate by intracellular or extracellular functioning. Extracellular S1P binds and activates specific cell surface receptors on the plasma membrane. These receptors are members of the group of G protein-coupled receptors. There are three subtypes of S1P receptors in the heart tissue (S1P₁, S1P₂, S1P₃). Exogenous S1P increases viability of cardiomyocytes after myocardial ischemia/reperfusion injury (I/R). It also reduces the

infarct size in isolated rat heart. During conditions of ischemic preconditioning (IPC) or postconditioning (IPOST) which consist of the short periods of ischemia before or after major ischemia insult generate S1P. Released S1P increased viability of the cell and faster recovery of hemodynamic functions in the heart tissue. Effects of S1P and its role in cardioprotection are explored in the genetically modified organisms mainly in the mice. The evidence of the cardioprotective effect of S1P were experiments using knock-out (KO) of the genes for SK. This led to the elimination of the cardioprotective effect of IPC and IPOST. Studies of S1P function bring new S1P receptor agonists and antagonists such as FTY720 which the scientists use in the clinical practice and to the development of S1P effects.

Key words: cardioprotection, lipid signaling, sphingolipids, sphingosin kinase, sphingosin-1-phosphate, ischemic preconditioning, ischemic postconditioning

2. Seznam použitých zkratk

SK 1/2 – sfingosinkináza 1/2
S1P – sfingosin-1-fosfát
S1P₁₋₅ – receptory sfingosin-1-fosfátu
I/R – ischemie a reperfúze
NaBT – butyrát sodný
KO – knock-out
PKD – proteinkináza D
Akt – proteinkináza B
LVDP – left ventricular developer pressure
LVEDP – left ventricular end diastolic pressure
IPC – ischemický preconditioning
IPOST – ischemický postconditioning
LDL - low density lipoproteins
HDL - high density lipoproteins
ERK 1/2 - extracellular-signal-regulated kinases
GPCR - G protein coupled receptor
PKCε - protein kináza C
MPTP – mitochondrial permeability transition pore
ROS - reactive oxygen species
PI3K - fosfatidylinositol-3-kináza
DMS - N,N-dimethylsfingosin
TMS – trimethylsfingosin
WT – wild type
COX - cytochromoxidázy
SPT – serinpalmitoyltransferáza
CERS – ceramidsyntáza
CERT - ceramid přenášející protein
SMS – sfingomyelinsyntáza
CERK – ceramidkináza
CPP - ceramid-1-fosfátfosfatáza
nSMase1, nSMase2 a aSMase – sfingomyelináza

ASAH1,2 a ACER – ceramidáza

SPL – sfingosinfosfátlyáza

SPP/S1P-P – sfingosin-1-foszfátfosfatáza

3. Úvod

Sfingosinkinázy (SK) jsou enzymy, které katalyzují reakci sfingosinu za vzniku sfingosin-1-fosfátu. Jak sfingosin, tak sfingosin-1-fosfát patří do třídy sfingolipidů, které se řadí mezi membránové lipidy. Základem jejich molekuly je 18C alkohol sfingosin. Modifikací tohoto základu dostáváme velké množství látek, které mají důležitou úlohu v membránové struktuře, komunikaci buněk, regulují buněčnou odpověď, migraci, buněčnou diferenciaci a apoptózu. Hrají také zásadní roli ve vývoji, angiogenezi a kardiogenezi. Velmi často můžeme také nalézt naprosto odlišné působení látek patřících do skupiny sfingolipidů. Příkladem je ceramid/sfingosin-1-fosfátový reostat, kde osud buňky záleží na poměru těchto dvou látek.

Sfingosin-1-fosfát (S1P) je jedním ze sfingolipidů, který má kardioprotektivní účinek. Při jeho zvýšené syntéze a následné interakci s receptory dochází k zahájení sledu biochemických reakcí vedoucích k ochraně buňky před apoptózou způsobenou infarktem. Ischemie, nedokrvení tkáně, je předstupněm infarktu. Samotný infarkt je lokální odumření tkáně, ke kterému dochází při poklesu nebo zamezení přístupu okysličené krve. Zda dojde k infarktu, ischemické nekróze, záleží na mnoha faktorech. Mezi velmi citlivé tkáně patří právě srdce, ledviny, mícha a mozek. V těchto tkáních se důsledky ischemie dostavují záhy po jejím začátku a dochází k rozsáhlé apoptóze buněk. S1P také zprostředkovává prospěšný efekt při takzvaném ischemickém preconditioningu (IPC) nebo postconditioningu (IPOST), kdy jsou srdce vystavena ischemii. Je to právě S1P, který je schopen snížit účinky ischemie a zvyšovat přežití buněk, které by jinak byly odkázány k odumření.

Koncentrace S1P je řízena a udržována několika enzymy. Za jeho syntézu jsou zodpovědné právě sfingosinkinázy, které se v živých organismech vyskytují ve dvou izoformách. Otázkou je, která z nich a jak se v kardioprotekci uplatňuje. Přestože oba enzymy katalyzují tutéž reakci, předpokládá se, že za jeho protektivní efekt je zodpovědná SK1. Důležitost a zastoupení obou enzymů je zkoumáno na geneticky upravených organismech, především myších. V praxi se využívá knock-out (KO) genů pro jeden nebo druhý enzym. Řada pokusů potvrzuje nebo vyvrací zapojení obou enzymů v kardioprotekci způsobené S1P. Zbývá tedy tento problém dořešit.

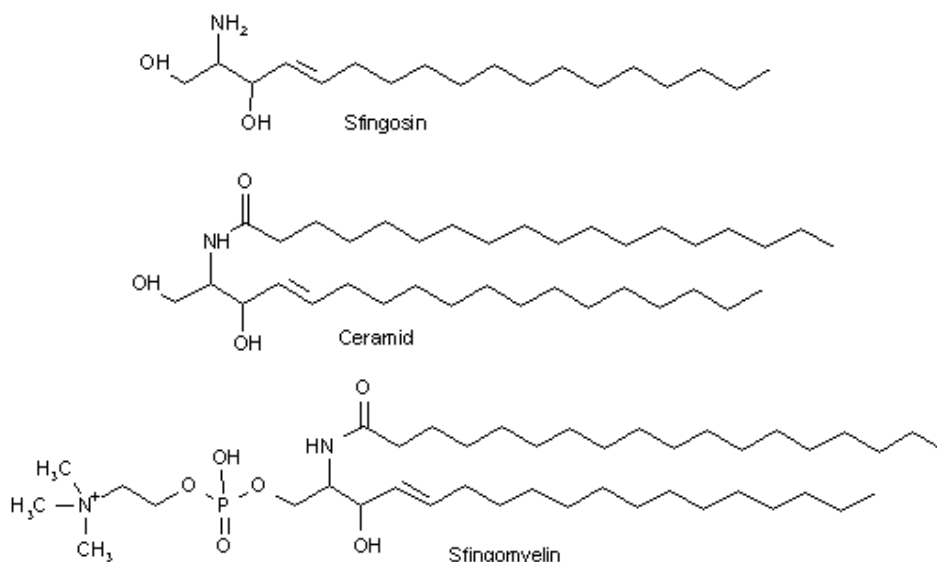
Díky velké rozmanitosti účinků S1P došlo k vývoji mnoha sloučenin, jejichž působení je totožné se S1P. Mezi tyto látky se řadí například Fingolimod, sloučenina, které je schopná se vázat na receptory S1P se stejným kardioprotektivním účinkem jako S1P. Byla také

schválena jako jeden z léků při léčbě roztroušené sklerózy. V současné době probíhá slibný vývoj dalších sloučenin kopírujících pozitivní efekt S1P.

4. Metabolismus sfingolipidů

4.1. Struktura

Sfingolipidy jsou membránové lipidy exponované především na vnější straně plazmatické membrány. Meziprodukty, které vznikají při jejich syntéze a degradaci, jsou velmi důležitými signálními molekulami. Ve své molekule obsahují alkohol sfingosin tvořený 18 uhlíky. Na druhý uhlík sfingosinu se amidovou vazbou váže mastná kyselina za vzniku ceramidu. Sfingolipidy se dělí na fosfosfingolipidy a glykosfingolipidy, podle toho zda mají na prvním uhlíku sfingosinu esterově vázanou kyselinu fosforečnou nebo glykosidickou vazbou vázané sacharidy. V živočišných tkáních je nejhojněji zastoupen fosfosfingolipid sfingomyelin (Hannun and Bell, 1989). Viz obr. 1



Obr. 1 Zástupci sfingolipidů odvozených od sfingosinu.

4.2. Syntéza sfingolipidů

Syntéza sfingolipidů začíná v endoplazmatickém retikulu kondenzací cytosolického L-serinu a palmitoyl - CoA na 3-ketosfinganin, reakci katalyzuje enzym serinpalmitoyltransferáza. Dále dochází k redukci na dihydrosfinganin enzymem 3-ketosfinganinreduktáza. Dihydrosfinganin je enzymem ceramidsyntáza přeměněn na dihydroceramid (Nikolova-Karakashian, 2011). V endoplazmatickém retikulu probíhá ještě následná desaturace na ceramid pomocí ceramiddesaturázy. Což vede ke vzniku dvojné vazby

v molekule ceramidu, který je prekurzorem pro syntézu různých druhů sfingolipidů (Gault et al., 2010). Viz obr. 2

Ceramid je dále přenesen do Golgiho aparátu pomocí vezikulárního transportu. V Golgiho aparátu se biosyntetická dráha dělí na syntézu fosfosfingolipidů a glykosfingolipidů. Enzymem sfingomyelinsyntáza je katalyzována syntéza sfingomyelinu. Pak následuje jeho přenos na plazmatickou membránu pomocí vezikulárního transportu nebo cytosolického ceramid přenášejícího proteinu. Sfingomyelin se skládá z ceramidové a fosfocholinové části a je významnou složkou vnější strany plazmatické membrány, kde je především důležitou složkou detergent rezistentních membránových domén jako jsou rafty (Riboni et al., 1997).

4.3. Katabolismus sfingolipidů

Degradace sfingolipidů probíhá buď na plazmatické membráně, nebo v lysozomech, kam jsou sfingolipidy přeneseny z plazmatické membrány pomocí vezikulárního transportu. Viz obr. 3

Na plazmatické membráně enzym sfingomyelináza hydrolyzuje sfingomyelin za vzniku ceramidu a fosfocholinu. Ceramid může být na plazmatické membráně opět přeměněn na sfingomyelin nebo pomocí ceramidázy degradován na sfingosin. Ten je fosforylován na S1P (Gault et al., 2010).

Všechny tři děje probíhající na plazmatické membráně jsou vratné a S1P může být přeměněn zpět na sfingomyelin. Pomocí enzymu sfingosin-1-fosfátfosfatázy (S1P-P) může dojít k přeměně S1P na sfingosin. Enzym ceramidsyntáza katalyzuje vznik ceramidu, následovaný syntézou sfingomyelinu díky enzymu sfingomyelinsyntázy (Gault et al., 2010).

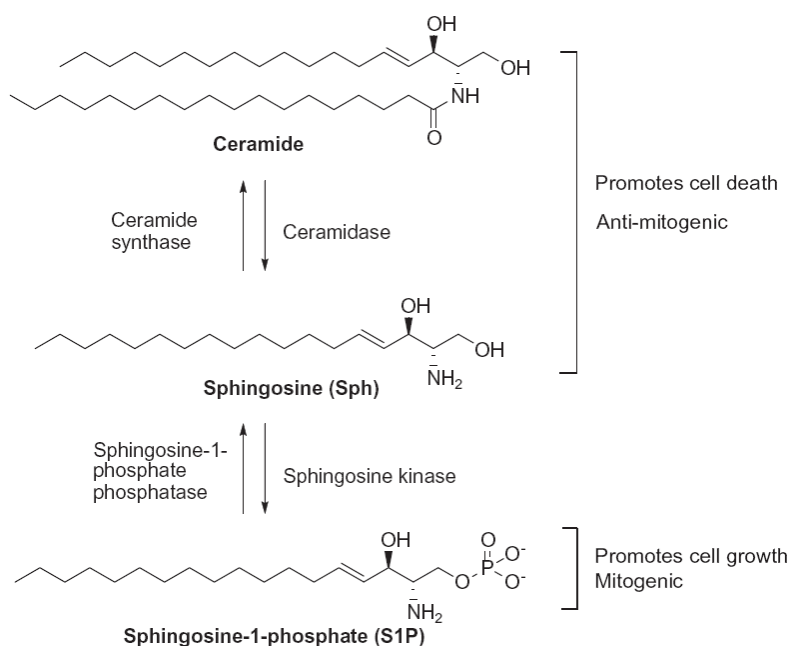
Podobným způsobem probíhá degradace sfingomyelinu v lysozomech, kde sfingomyelin přenesený z plazmatické membrány, je degradován až na sfingosin-1-fosfát (Nikolova-Karakashian and Reid, 2011).

Nevratným dějem probíhajícím v cytosolu je přeměna S1P pomocí sfingosin-1-fosfátlyázy na hexadecenal a fosfoetanolamin (Bandhuvula et al., 2011).

5. Sfingolipidové signální molekuly

Sfingolipidové signální molekuly vznikají během syntézy a degradace sfingolipidů. Účastní se buněčných odpovědí jako druzí posli. Jak vyplývá z předešlé kapitoly, jsou jimi sfingosin, ceramid, ceramid-1-fosfát a S1P. Samotné metabolity mohou působit v různých tkáních po celém těle. Jsou schopné ovlivňovat migraci, růst a stárnutí buněk. Jejich působením lze také spouštět signální dráhy vedoucí k autofágii, apoptóze nebo naopak k protekci buněk (Gault et al., 2010).

Ceramid a S1P jsou bioaktivní mediátory s opačnou funkcí. Ceramid je mediátor apoptózy naproti tomu, S1P buněčnou smrt potlačuje a podporuje přežívání buněk. Tento protichůdných efekt, a rovnováha mezi ceramidem a S1P, byl nazván sfingolipidový reostat, který může určovat osud samotných buněk. Závisí tedy na množství enzymů, které katalyzují vznik ceramidu a S1P. Vychýlením rovnováhy jejich koncentrací se spouští sled zásadních reakcí vedoucích k zániku nebo přežití buňky (Pyne and Pyne, 2000). Viz obr. 4

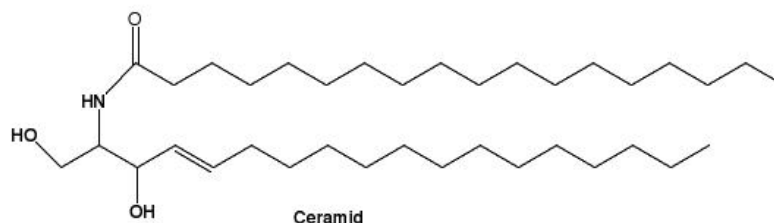


Obr. 4 Ceramid/SIP reostat (Raje et al., 2012a).

5.1. Ceramid

Ceramid je základní stavební molekulou sfingolipidů. Nachází se v membránách živočišných buněk a hojně se vyskytuje také v šedé kůře mozkové. Je to derivát sfingosinu, na jehož aminoskupině má navázán zbytek mastné kyseliny (Riboni et al., 1997). Ceramidy ovlivňují elektrontransportní řetězec na vnitřní membráně mitochondrií. To může vést k tomu,

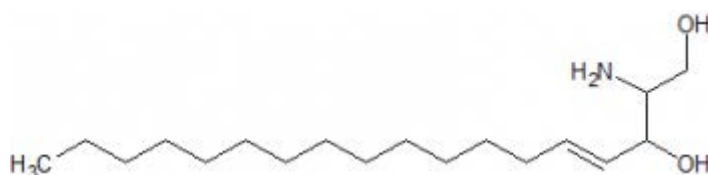
že buňka nebude mít dostatek energie. Selhání vede ke zvýšení oxidačního stresu. Následkem může být poškození DNA, aktivace jaderných enzymů a uvolnění apoptózu indukujícího faktoru z mitochondrií do jádra, což způsobí smrt buňky. Podobně funguje i v případě nádorových onemocnění, kde právě ceramid je jednou z molekul, která je schopná spouštět apoptózu nádorových buněk nebo indukovat jejich anti-proliferaci (Maceyka et al., 2002). Viz obr. 5



Obr. 5 Ceramid

5.2. Sfingosin

Sfingosin vzniká v Golgiho aparátu jako jeden z produktů štěpení ceramidu, který byl přenesen z endoplazmatického retikula. Enzymem katalyzujícím tuto reakci je ceramidáza. Sfingosin je prekurzorem pro S1P. Společně s ceramidem patří do skupiny signálních molekul s proapoptitickým účinkem (Maceyka et al., 2002). Podporuje apoptózu a stárnutí buňky, ovšem záleží na jeho množství. Ve vyšších dávkách během ischemie je kardiotoxický, ale v případě malých dávek byl pozorován jeho kardioprotektivní účinek a snížení rozsahu infarktem zasažené části myokardu (Vessey et al., 2008b). Viz obr. 6

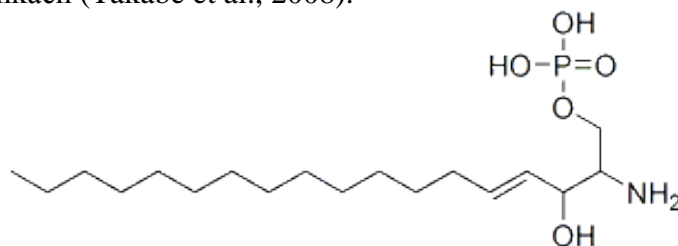


Obr. 6 Sfingosin

5.3. Sfingosin-1-fosfát

S1P je bioaktivní sfingolipid, který působí autokrinně nebo parakrinně tak, že se naváže na S1P receptory na plazmatické membráně příslušných buněk. Podílí se na stimulaci buněčné proliferace, inhibice apoptózy, regulaci buněčné odpovědi a regulaci buněčného tvaru a pohybu. Vzniká při degradaci sfingomyelinu (Yatomi et al., 2001) Viz obr. 7. Nejdůležitějším enzymem, který katalyzuje přeměnu na S1P, jsou sfingosinkinázy. S1P je

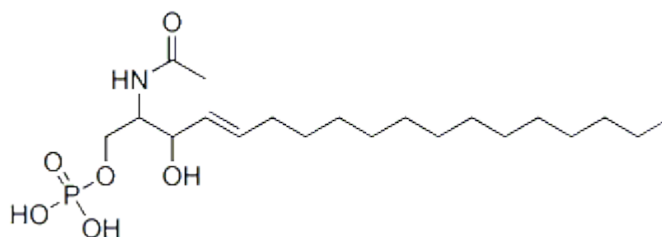
schopen ovlivňovat kardiomyocyty po navázání na své receptory na srdečním svalu a endoteliálních buňkách (Takabe et al., 2008).



Obr. 7 Sřingosin-1-fosfát

5.4. Ceramid-1-fosfát

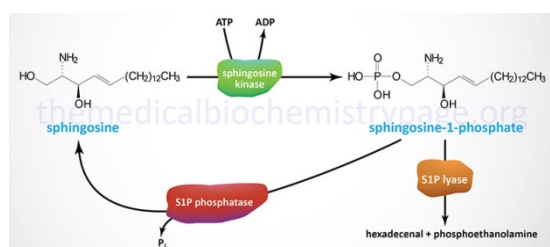
Ceramid-1-fosfát je syntetizován z ceramidu enzymem ceramidkinázou. Je podobně jako S1P jedním z klíčových faktorů v buněčném růstu a přeřívání. Stimuluje syntézu DNA a je také účinným inhibitorem apoptózy. (Arana et al., 2010).



Obr. 8 Ceramid-1-fosfát

6. Sřingosinkinázy

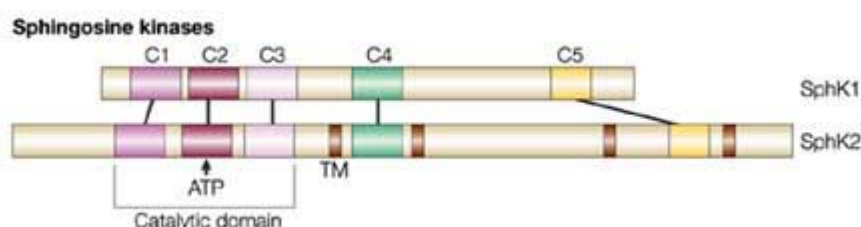
Sřingosinkinázy představují enzymy účastnící se katabolizmu sřingolipidů. V buněčných tkáních se vyskytují ve dvou izoformách - sřingosinkináza 1 (SK1) a sřingosinkináza 2 (SK2). Katalyzují reakci přeměny sřingosinu na S1P (Kohama et al., 1998). Viz obr. 9



Obr. 9 Syntéza sřingosin-1-fosfátu je katalyzována sřingosinkinázou. Mnořství sřingosin-1-fosfátu v tkáních je regulováno enzymy sřingosinkinázou, sřingosinlyázou a sřingosin-1-fosfát fosfatázou (King, 2015).

6.1. Struktura a funkce SK1 a SK2

Z molekulárního hlediska mají SK 5 konzervovaných domén C1-5 a katalytickou doménu, která se nachází v doménách C1-3. Sekvence kódující SK2 navíc obsahuje transmembránové oblasti mezi doménami C3 a C4. Přestože jsou sekvence obou SK téměř homologní, pravděpodobně nevznikly prostou genovou duplikací. U SK1 dochází k nejvyšší expresi v plicích a slezině na rozdíl od SK2, která má vyšší zastoupení v játrech a v srdci. Lidské geny pro SK se nacházejí na chromozomech 17q25,2 a 29q13,2. Exprese obou genů se také liší během embryonálního vývoje. Při pokusech na myších embryích bylo zjištěno, že exprese SK1 je nejvyšší 7. den embryonálního vývoje. Na druhou stranu SK2 je detekovatelná až 11. den. Viz obr. 10



Obr. 10 Genová sekvence sfingosinkináz (Spiegel and Milstien, 2003).

Přestože geny pro obě SK jsou si velmi blízké svou strukturou, existují doklady, že jejich úlohy v buněčných tkáních mají protichůdný efekt. SK1 je proliferační a antiapoptotická. Její zvýšená exprese podporuje buněčný růst, migraci buněk a angiogenezi. Úloha SK2 je méně jasná a prozkoumaná. Studie ale naznačují, že má proapoptotický a antiproliferační vliv a může tedy buněčný růst inhibovat. Aktivovaná SK2 zvyšuje hladinu cytochromu c uvolněného z mitochondrií. Tím dochází k aktivaci kaspázové kaskády, což je jeden ze spouštějících mechanismů apoptózy. Tento velmi dominantní rozdíl je pravděpodobně způsobený tím, že každá z kináz se vyskytuje v odlišných kompartmentech uvnitř buněk a tak i produkce S1P je lokalizována na jiných místech a vzniklý S1P má i odlišnou funkci (Maceyka et al., 2005). SK1 se vyskytuje především v cytoplasmě, kdežto SK2 je lokalizována v jádře a na endoplazmatickém retikulu (Igarashi et al., 2003). Různé role jsou také patrné v regulaci hladiny ceramidu v buňce. Exprese SK1 hladinu ceramidu snižuje tím, že inhibuje ceramidázu. Při zvýšené expresi SK2 dochází k opačnému efektu (Maceyka et al., 2005).

Dalším důležitým poznatkem je, že se poměr mezi SK1 a SK2 dramaticky mění se stárnutím daného druhu. Aktivita SK2 s věkem klesá, na rozdíl od aktivity SK1, která se prakticky nemění (Vessey et al., 2011).

S1P produkovaný enzymem SK2 neinteraguje s S1P receptory, na rozdíl od S1P, který vzniká aktivitou SK1 a váže se na receptory spřažené s G-proteiny. Tento jev byl potvrzen: 1) pokusy s pertusis toxinem, který blokuje S1P receptory; 2) v experimentech s KO modely myši s delecí pro geny receptorů, kde i přesto byla sfingosinkináza 2 schopná indukovat apoptózu buněk (Liu et al., 2003). Bylo publikováno, že funkce SK2 by se také mohla uplatňovat v mechanismu kardioprotekce. Ukázalo se totiž, že syntéza S1P enzymem SK2 v mitochondriích je velmi důležitá pro správné sestavení dýchacího řetězce a její aktivita následně slouží k omezení produkce volných radikálů produkovaných tímto řetězcem (Vessey et al., 2011).

Další funkcí SK2 je její zapojení v rakovinných procesech. Podle výzkumu rakovinných buněk tlustého střeva, kde se zkoumala role SK2 při apoptóze indukované butyrátem sodným (NaBT) bylo zjištěno, že zvýšená exprese SK2 může naopak rakovinné buňky před apoptózou chránit a tudíž je potřebná k jejich přežívání. Při přidání NaBT k rakovinným buňkám, došlo k přesunu SK2 z jádra do cytoplazmy a k jejímu hromadění v cytoplasmě. To apoptózu snížilo. Další důležitým elementem v buněčné proliferaci a apoptóze se ukázala být proteinkináza D (PKD), když při jejím knock-out (KO) genu došlo k inhibici hromadění SK2 v cytoplasmě a k většímu rozsahu apoptózy.

Z toho vyplývá, že SK2 společně s PKD jsou pravděpodobně zapojeny v mechanismu, který chrání rakovinné buňky před chemoterapií, což je v současné klinické praxi velký problém. Obě jsou tedy potenciálními cílovými molekulami pro vývoj protirakovinných léčiv a jejich následná regulace by mohla být novou strategií v boji proti rezistentním nádorům (Xiao et al., 2012). Podobnou anti-apoptotickou vlastnost SK2 můžeme nalézt i u dalších typů rakoviny, jako jsou nádory prsu nebo prostaty (Raje et al., 2012a).

6.2. Úloha v endogenní protekci myokardu

Pokud srdeční tkáň vystavíme ischemii a reperfúzi (I/R), což znamená omezení přístupu krve do tkáně a následné obnově průtoku krve, dojde k I/R poškození. Srdeční poškození se projeví sledem událostí, které zahrnují špatnou obnovu hemodynamické funkce (LVDP – left ventricular developer pressure a LVEDP – left ventricular end diastolic pressure) po reperfúzi, rozvoj rozsáhlého infarktu, tvorbu volných radikálů, aktivaci cytokininů a přetížení tkáně vápenatými ionty (Cannon, 2005). V srdci je možné redukovat

tato poranění farmakologickým a nefarmakologickým způsobem. Jednou z možností, které mohou snížit I/R poškození jsou právě sfingolipidové metabolity, které se uvolňují při procesech zvaných ischemický preconditioning (IPC) nebo ischemický postconditioning (IPOST), které představují krátké periody ischemie aplikované před nebo po ischemickém ataku.

Vědci zkoumali zapojení SK a produktu její aktivity S1P ve fenoménu IPC a IPOST a jejich úlohu v kardioprotekci. Tento problém byl zkoumán u různých živočišných druhů. Ukázalo se, že celého procesu se účastní více signálních molekul a receptorů, které slouží jako spouštěče a mediátory této dráhy.

S1P se nachází především v erytrocytech, krevních destičkách a endoteliálních buňkách. Jeho koncentrace v krevní plasmě se pohybuje okolo 200-1000nM. V buněčných tkáních je přenášen z 50-70% HDL (high density lipoproteins), z 30% albuminem a z méně než 10% LDL (low density lipoproteins) (Sattler and Levkau, 2009). S1P je schopen působit na buňky autokrinně, parakrinně nebo endokrinně. Buňku kde vznikl, může tedy ovlivnit zevnitř nebo vně pomocí receptorů nebo může putovat krevním řečištěm dál a ovlivňovat jiné buňky. V 90. letech poprvé zjistili, že S1P indukovaná aktivace mapkinázami ERK-1/2 (extracellular-signal-regulated kinases) je blokována pertusis toxinem, který brání párování s receptory GPCR (G protein coupled receptor). To byl první důkaz o tom, že se S1P na membráně váže na receptor. Během výzkumu bylo v živočišných tkáních rozpoznáno 5 druhů receptorů pro sfingosin-1-fosfát (S1P₁₋₅). V srdeční tkáni můžeme najít S1P₁, S1P₂ a S1P₃. Receptory S1P₄ a S1P₅ se nalézají v imunitním respektive nervovém systému. Vědci se pokoušeli zjistit, jak důležitou roli každý z nich hraje (Nakade et al., 2003).

6.2.1. Receptory S1P

S1P receptory jsou nedílnou součástí extracelulárního spuštění kaskády procesů. Fyziologický efekt S1P v extracelulárním prostoru je určen podle toho, na který receptor se naváže a s jakým G-proteinem je receptor spřažen.

K expresi S1P₁ receptoru dochází na endoteliálních buňkách, kde je velmi důležitý v embryonálním vývoji a při angiogenezi (Liu et al., 2000). Podporuje migraci buněk a redukuje vaskulární permeabilitu. Jako ostatní receptory je spojený s G-proteiny. KO S1P₁ je letální již v embryonálním vývoji. Receptor S1P₁ hraje roli pravděpodobně také v udržování cévní integrity (Singleton et al., 2005). Pokud dojde k expresi tohoto receptoru na lymfocytech, je odpovědný za jejich migraci z thymu a lymfatických uzlin do krevního oběhu. Jeho delece způsobuje, že lymfocyty nejsou schopné opustit uzliny (Rosen et al., 2007).

Receptor S1P₂ působí opačně než receptor S1P₁ a S1P₃. Inhibuje angiogenezi, migraci buněk a zvyšuje vaskulární permeabilitu (Singleton et al., 2005). Pravděpodobně je ve vývoji srdce postradatelný. Naopak je důležitý pro správnou integritu centrálního nervového systému v mladém věku a ve vývoji středního ucha v dospělosti. K jeho expresi dochází pouze v určitých typech endoteliálních buněk (Yatomi et al., 2001).

Receptor S1P₃ je exprimován na endoteliálních buňkách a v kardiomyocytech. Aktivací tohoto receptoru dochází k bradykardii a zvyšuje se vaskulární permeabilita. Modelové myši s KO genem pro S1P₃ mají normální fenotyp, ale při deleci tohoto genu dochází k eliminaci některých efektů S1P na kardiovaskulární systém (Sanna et al., 2004).

Pokud došlo ke KO jednoho z receptorů S1P₂ nebo S1P₃ a srdce byla vystavena I/R, nemělo to na velikost infarktu žádný vliv. Došlo pouze k několika změnám ve fenotypu. V případě KO obou receptorů se velikost infarktu zvýšila o 50% oproti kontrolám.

Nejstarším pokusem z roku 2001 dokládajícím pozitivní účinky S1P byl experiment, kdy byly použity kardiomyocyty ze srdcí potkanů. Buňky byly nejprve vystaveny normoxii, při použití normální hodnoty O₂ ve tkáních, a bylo zaznamenáno 90% přeživších buněk. Následně byly buňky vystaveny hypoxii, nedostatku kyslíku, zde bylo nalezeno pouze 61,3% přeživších buněk. Pokud byly ovšem buňky preinkubovány se S1P, zachovala se jejich životaschopnost (Knapp, 2011)*. V dalších pokusech byly buňky podrobeny několika epizodám normoxie a hypoxie před I/R. S1P přidaný k médiu zvýšil přežití buněk až na 93%. Tento efekt je totožný s IPC, při kterém dochází ke zvyšování uvolňování S1P do média. Z toho vyplývá, že S1P má kardioprotektivní účinky a potvrzuje jeho roli v ochranném účinku IPC.

Experiment na izolovaných srdcích doložil, že infúze ceramidu, TNF α a S1P do média s kardiomyocyty má stejný účinek na redukcii rozsahu infarktu jako IPC. Výsledkem bylo konstatování, že kardioprotektivní účinek TNF α je způsobený S1P a ne samotným ceramidem. S1P přidaný na médium, snížil rozsah infarktu až o 50%. Urychlil obnovu LVDP skoro na 80% a zredukoval LVEDP. Výsledky provedené na izolovaných kardiomyocytech byly obdobné jako na izolovaných srdcích (Vessey et al., 2008a).

6.2.2. Kardioprotektivní účinek sfingosin-1-fosfátu

Bylo ukázáno, že S1P je jedním z agonistů, které se uplatňují při aktivaci signální kaskády vedoucí ke kardioprotektivnímu efektu. Z myocytů se uvolňují přes pannexin-1/P2X₇ kanály jako odpověď na IPC. Mezi ostatní agonisty patří adenosin, bradykini, opioid apod. S1P se váže na receptory spřažené s G-proteiny a zahajuje buněčnou odpověď (Vessey et al.,

2011). Dochází k aktivaci PKC ϵ (protein kináza C), která fosforyluje SK1 a zvyšuje tak její aktivitu. SK1 přestože je to cytosolický enzym, je díky aktivaci PKC ϵ translokována na plazmatickou membránu, kde katalyzuje reakci produkce S1P (Johnson et al., 2002). Význam PKC ϵ potvrdil pokus s KO myšmi, kdy se ukázalo, že zvýšená aktivita SK1 způsobená IPC byla v těchto organismech z hlediska kardioprotekce nefunkční (Jin et al., 2004).

S1P může ovlivnit osud buňky intracelulárně nebo spojením s S1P receptory spřaženými s G-proteiny jako druhý posel, čímž zahájí přenos signálu.

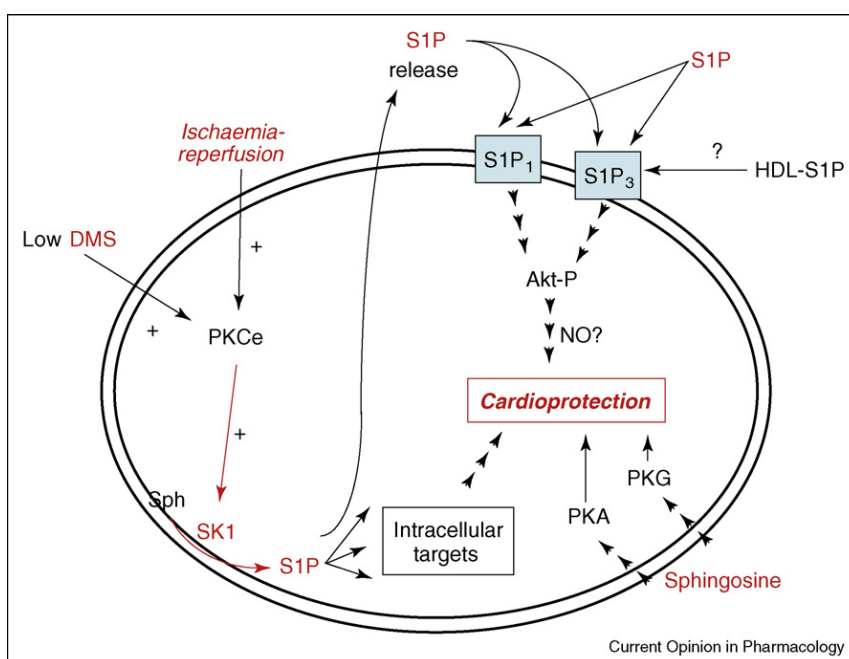
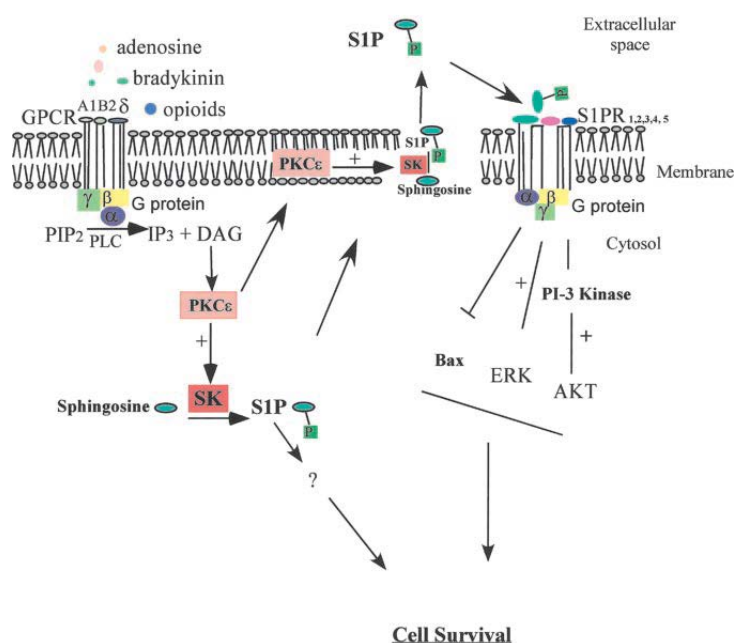
Intracelulární působení S1P vede k podpoře přežívání buňky, ovšem není zcela jasné jak. Pravděpodobně bude záležet na přesné lokaci syntézy S1P. Může také působit přímo v jádře a ovlivňovat genovou expresi různých proteinů (Strub et al., 2010).

Druhou cestou může S1P opustit buňku a navázat se na jejím povrchu na receptory GPCR a spouštět kaskádu vedoucí k tvorbě signálu pro buněčné přežití (Jin et al., 2004). Při ischemickém poškození dochází na začátku reperfúze k otevírání mitochondriálních pórů (MPTP - mitochondrial permeability transition pore). Výsledkem toho je oxidační stres spojený se zvýšenou produkcí ROS (reactive oxygen species), čímž se tyto póry otevírají a roste počet nekrotizujících buněk. Otevření MPTP způsobuje bobtnání mitochondrií a trhliny ve vnější membráně. To následně vede k vylití pro-apoptotických faktorů včetně cytochromu c a aktivaci kaspázové kaskády vedoucí k apoptóze buněk.

IPC a IPOST prostřednictvím S1P inhibují otevření MPTP póru během reperfúze, což je protektivní. Jako zprostředkovatelé pro přenos signálu zde vystupují proteinkináza B (Akt), signál rozpoznávající proteinkinázy ERK1/2, fosfatidylinositol-3-kináza (PI3K) a protein tyrozin kináza.

Navázáním S1P na receptory se spustí sled událostí vedoucí k aktivaci PI3K nebo mitogen-aktivované protein kinázy. Tím dojde k fosforylaci a aktivaci ERK 1/2 a kinázy Akt, které slouží jako prostředníci v indukci kardioprotekce způsobené S1P. V mitochondriích je inhibováno otevření MPTP pórů doprovázené urychlenou obnovou hemodynamických funkcí srdce a redukcí infarktového ložiska (Strub et al., 2010). Viz obr. 11

IPC



Obr. 11 Celý proces začíná IPC, tím se uvolní agonisté a naváží na receptor. PKCε translokují na plazmatickou membránu a fosforyluje SK1, která produkuje S1P. Uvolněný S1P putuje do extracelulárního prostoru a naváže se na receptory a účastní se tak stimulace dráhy kardioprotekce přes signál rozpoznávající kinázy. S1P, který vzniká intracelulárně má také kardioprotektivní účinky, dosud však není zcela jasné, jak proces probíhá. (Jin et al., 2004; Kennedy et al., 2009). DMS – dimethylsphingosin, Akt- proteinkináza B, PI3K - fosfatidylinositol-3-kináza, PKA –proteinkináza A

6.2.3. Aktivátory a inhibitory SK1

Gangliosid GM1 je aktivátorem SK1. Je schopen stimulovat produkci S1P. Indukuje totiž translokaci PKC ϵ na plazmatickou membránu (Singleton et al., 2005), takže protektivní efekt je spojený s mechanismem zahrnujícím PKC ϵ . Bylo publikováno, že GM1 chrání izolované srdeční fibroblasty před apoptózou (Jin et al., 2002).

Na rozdíl od GM1, N,N-dimethylsfinosin (DMS) inhibuje aktivitu PKC ϵ a SK1. Je to endogenní methylovaný produkt sfingosinu. Tato látka ruší kardioprotektivní účinek IPC na hemodynamiku srdce a rozsah infarktu (Jin et al., 2004). Experimenty *in vitro* potvrdily, že ovlivňuje transmembránovou signalizaci přes inhibici PKC ϵ a tím její aktivitu a také zvyšuje aktivitu tyrozinkinázy (Igarashi et al., 1990). DMS dále zvyšuje autofosforylaci EGF receptoru (epidermal growth factor). Ten je společně s tyrozinkinázami zahrnut v kardioprotekci proti I/R poranění.

Výsledkem dalších pokusů ovšem bylo zjištěno, že DMS v malém množství je kardioprotektivní. Koncentrace 0,3 a 1 μ M po dobu 10 min má kardioprotektivní efekt v odpovědi na ischemii a jí způsobené následné odumírání tkáně. DMS indukovaná kardioprotekce u myších srdcí byla v KO PKC ϵ nefunkční. Z toho vyplývá, že aktivace SK1 díky podání DMS je PKC ϵ závislá. U DMS tedy můžeme pozorovat dvojí účinek závislý na velikosti dávky (Jin and Karliner, 2006). Pozitivní kardioprotektivní účinek, který redukoval rozsah infarktu a poškození tkáně byl nalezen také u trimethylsfinosinu (TMS) (Kennedy et al., 2009).

6.3. Důkazy potvrzující protektivní účinky sfingosinkinázy 1

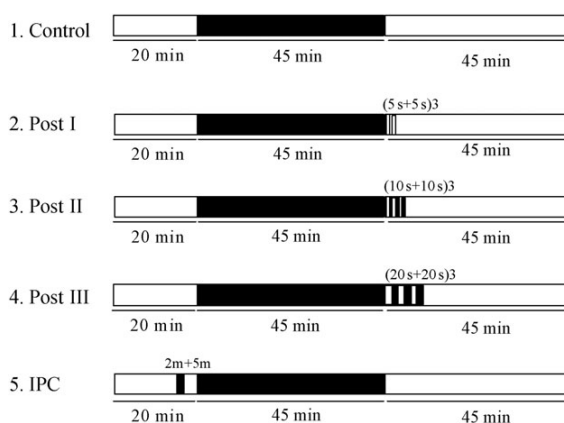
Hlavním cílem vědců bylo provést pokusy potvrzující nebo vyvracející kardioprotektivní účinek SK1 s použitím myší s KO genem pro SK1. Tak bylo možno zjistit, jak ovlivní nefunkční SK1 endogenní kardioprotekci.

V pokusu u myší s delecí exonu v genu pro SK1 (KO SK1) byl použit IPC, při kterém se u kontroly zvyšuje obsah S1P s protektivním účinkem. Kontrolní skupinou byly WT (wild-type) myši. U KO SK1 myší došlo k redukci aktivity SK1 a k poklesu koncentrace S1P ve tkáni. Mezi WT a KO SK1 nebyly pozorovány žádné změny fenotypu a ani rozdíly v srdeční funkci. Po aplikaci 50 min ischemie a 40 min reperfúze, byla obnova LVDP u KO SK1 znatelně nižší než u WT myší (Vessey et al., 2011). Naopak LVEDP a dopad ischemie na srdeční funkci a rozsah infarktu v KO SK1 byl vyšší. IPC zvýšil srdeční výkon u WT srdcí, ale byl neúčinný u KO SK1 myší, kde došlo k rozsáhlé apoptóze. Toto byl první důkaz

s použitím geneticky modifikovaných zvířat, který ukázal, že SK1 je kinázou důležitou pro přežívání buněk a pro kardioprotektivní účinek IPC v srdeční tkáni (Jin et al., 2004).

Druhou možností chránící srdce s obdobnou funkcí jako IPC je IPOST. Stejně jako IPC zvyšuje srdeční funkci, redukuje rozsah infarktu a snižuje arytmie. (Zhao et al., 2003) Vědci provedli stejný pokus jako předchozí pokus s IPC s využitím geneticky modifikovaných myší. První skupina měla delecí exonů 3-6 v genu pro SK1 (KO SK1) a kontrolní skupina byla WT. Po 45 min ischemii a 45 min reperfúze byl rozsah infarktu znatelně větší v KO SK1 než u WT myší. IPOST byl proveden na začátku reperfúze ve třech cyklech, které se skládaly z 5-20 s ischemií a 5-20 s reperfúzí. Do pokusu byla přidána i skupina, kde byl použit IPC, představující 2 min ischemie a 5 min reperfúze. Ukázalo se, že pro kardioprotektivní efekt jsou nejučinnější kratší 5 - ti s cykly jak u IPC, tak u IPOST (Jin et al., 2008). Viz obr. 12

Z pokusu vyplývá, že IPC a IPOST se opírají o stejný signální mechanismus zahrnující aktivaci SK1, Akt a ERK. (Jin et al., 2008)

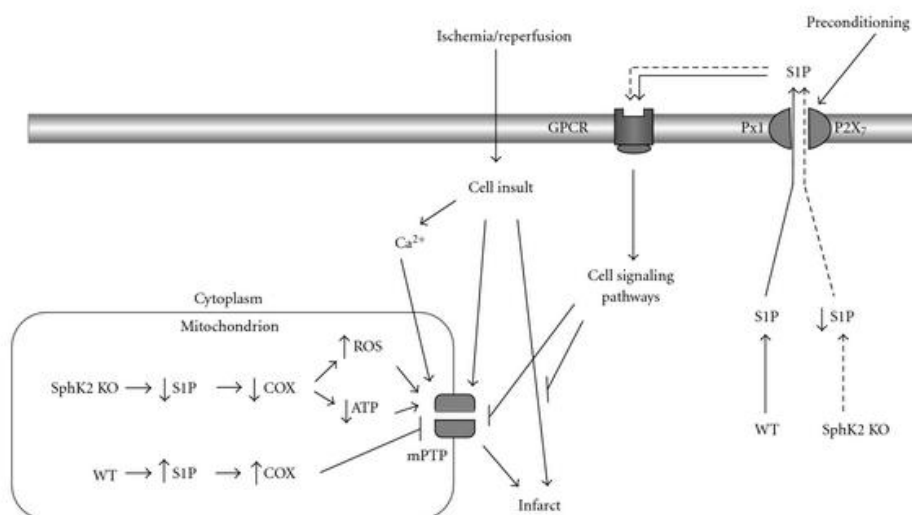


Obr. 12 Protokol z pokusu IPC (ischemický preconditioning) a IPOST (Post – ischemický postconditioning) aplikovaného na myších srdcích. Černé úseky – ischemie, bílé pole – reperfúze (Jin et al., 2008)

6.4. Důkazy potvrzující protektivní účinky sfingosinkinázy 2

Ve studiích, které se zabývaly úlohou SK2 v kardioprotekci se použily myší srdce s delecí exonů 2-5 v genu pro SK2, čímž došlo ke ztrátě její aktivity. Kontrolní skupinou byla WT srdce. Cílem bylo zjistit, zda SK2 ovlivňuje citlivost srdce k I/R poškození a jak reaguje na IPC a IPOST (Vessey et al., 2011).

Pokusy byly prováděny na izolovaných myších srdcích perfundovaných na Langendorffově přístroji. Byl předpokládán opačný efekt u SK2 než u SK1. Očekávalo se, že SK2 nemá vliv na kardioprotektivní účinek, tudíž v případě KO jejího nedojde k velkým změnám. To se ovšem nepotvrdilo a navíc se nezvýšila ani aktivita SK1. Srdce byla vystavena 40 min ischemie a 40 min reperfúze. IPC se skládalo z 2 min ischemie a 2 min reperfúze, a to ve dvou cyklech, které předcházely hlavní ischemii. Došlo ke snížení obnovy LVDP u srdcí KO SK2 myši. Rozsah infarktu byl jednoznačně vyšší v porovnání s kontrolní WT skupinou, což potvrzuje zvýšenou citlivost KO SK2 myši k I/R poranění a odstranění kardioprotektivního účinku IPC. Účinek IPC ve WT myších srdcích byl podle očekávání kardioprotektivní (Vessey et al., 2011). Provedené experimenty tedy vyvrátily původní předpoklad, že SK2 nehraje roli v kardioprotekci. Další potvrzení přinesly pokusy na izolovaných buňkách, které potvrdily důležitou roli SK2 ve zprostředkování kardioprotekce a také její nezbytnost při IPC v srdeční tkáni. Výsledkem IPC je uvolnění S1P z myocytů a navázání na receptory spřažené s G-proteiny, čímž se spouští kardioprotektivní odpověď. Nepostradatelná role SK2 spočívá tedy v tom, že přispívá k udržení optimální koncentrace intracelulárního S1P. Ten se uvolňuje během „conditioningu“, a tím dochází k maximální extracelulární signalizaci přes receptory (Vessey et al., 2013). SK2 je také důležitá pro správnou funkci cytochromoxidázy (COX), která je v KO SK2 myších defektní. Pokles její aktivity vede k hromadění elektronů, což způsobuje oxidační stres. Zvyšující se hladina ROS způsobuje otevírání MPTP. Následkem toho dochází ke zvětšení I/R poškození během reperfúze (Halestrap et al., 2007). Viz obr. 13. Tyto experimenty vyvrátily prvotní představu, že SK mají opačný účinek, tzn. SK1 proliferální a SK2 proapoptotický. Z výzkumu vyplývá, že v KO SK2 myších došlo k většímu poškození srdeční tkáně a kardioprotektivní účinek IPC a IPOST vymizel. Stejný protektivní účinek SK2 byl mimo jiné pozorován i v tkáni ledvin vystavené I/R (Jo et al., 2009).



Obr. 13 Hlavní rozdíly ve WT a KO SK2 myších při IR a IPC. U WT srdcí dochází k uvolnění S1P přes kanály v plazmatické membráně, navázání S1P na receptory (GPCR) a spuštění buněčné signální dráhy s protektivními účinky. Tím také není umožněno otevření mitochondriálních pórů (mPTP), což by způsobilo větší rozsah poškození. U KO SK2 srdcí je udržována nízká hladina S1P, proto nedochází ke spuštění signální dráhy. Tím dochází k poruše funkce cytochromoxidázy (COX), což vede k akumulaci ROS a podpoře otevírání mPTP. ROS způsobí k hromadění Ca²⁺ iontů, které také podporují otevírání mPTP (Vessey et al., 2011).

6.5. Sfingosin-1-fosfát jako součást protektivního účinku HDL

V klinických pokusech, kdy byly podávány rekombinantní HDL částice, docházelo ke snížení kardiovaskulárního rizika (Theilmeier et al., 2006). Jako součást lidských HDL bylo identifikováno několik sfingolipidů a jedním z nich je právě S1P, vzniklý reakcí katalyzovanou SK. Ten je podle výzkumu zodpovědný za několik funkcí HDL. Jednou z nich je i např. jejich vasodilatační účinek (Kimura et al., 2001). HDL dále inhibují adhezi leukocytů, aktivují endotel *in vitro* a redukují infiltraci leukocytů do oblasti zasažené infarktem *in vivo*. S1P a HDL oba generují v buňkách oxid dusný NO, který hraje důležitou roli v ochraně před I/R poškozením. Vědci zkoumali, zda pozitivní účinek HDL je způsobený přítomností S1P na těchto částicích. Ukázalo se, že k tomu aby mohlo dojít k NO-dependentní vasodilataci způsobené S1P nebo HDL je potřeba přítomnost receptoru S1P₃. To bylo prokázáno v experimentu na myších s KO geny pro receptor S1P₃, kde S1P ani HDL neměly protektivní účinky. Oba také chrání kardiomyocyty před apoptózou. Tyto experimenty

potvrdily, že schopnost HDL přímo chránit myokard před I/R poškozením, je pravděpodobně dána přítomností S1P (Theilmeier et al., 2006).

7. Využití syntetických agonistů a antagonistů receptorů pro sfingosin-1-fosfát v klinické praxi

V posledních letech se výzkum intenzivně zabývá množstvím sfingolipidových mediátorů a jejich klíčovou rolí v regulaci buněčné odpovědi, v migraci imunitních buněk, v léčbě nádorových onemocnění a angiogenezi. Pokusy přinesly první schválenou sloučeninu, dnes již používanou v klinické praxi a nové strategie v léčbě různých nemocí. Experimenty potvrzující kladné účinky S1P vedou k dalším výzkumům, rozšiřování a prohlubování znalostí na tomto biologickém poli. Nově objevené sloučeniny jsou kategorizovány podle toho, jaký mají účinek, zda jsou to agonisté či antagonisté a s jakým druhem S1P receptorů reagují.

7.1. Agonisté sfingosin-1-fosfátu

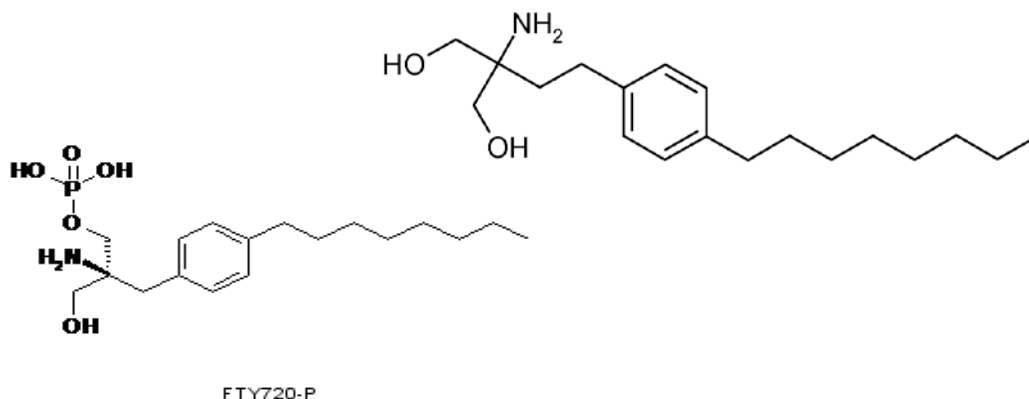
FTY720

FTY720 neboli sloučenina s názvem Fingolimod je homologní analog S1P se silnými imunomodulujícími vlastnostmi. Získává se z antibiotika myriocinu, což je jedna ze složek čínské byliny *Iscaria sinclarii* a používá se k léčbě astmatu. Fingolimod je fosforylován SK2 na FTY720-P. Ve fosforylované formě působí jako agonista. Je schopen se navázat S1P receptory 1, 3, 4 a 5. Fingolimod dokáže snižovat počty T a B lymfocytů v krvi tím, že je směřuje do sekundárních lymfoidních orgánů. Největší imunomodulující efekt vzniká při vazbě na S1P₁ na lymfocytech (Allende et al., 2004). Je také schválen jako lék pro léčbu roztroušené sklerózy.

V dalších pokusech byl patrný i proapoptotický účinek FTY720. Při studiu efektu FTY720 při různých typech rakoviny došli vědci k závěru, že FTY720 je schopný indukovat apoptózu a redukovat růst nádoru bez dalších vedlejších efektů. Tato apoptotická schopnost souvisí s aktivací kaspázy 3 a defosforylací Akt pomocí fosfatázy, která je aktivovaná díky FTY720 (Huwiler and Zangemeister-Wittke, 2007).

Při pokusech s myšími kardiomyocyty FTY720 dokazoval stejné účinky jako S1P a při vystavení buněk dlouhé hypoxii zvyšoval procenta jejich přežití. Naproti tomu při podání analogu lidem došlo v pokusech ke zpomalení srdeční činnosti. Tento jev byl přičítán tomu, že FTY720 aktivuje jak receptor S1P₁ tak S1P₃. Následně byla v klinickém pokusu

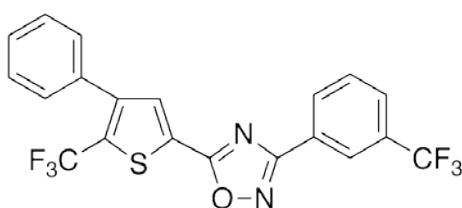
zaznamenána smrt pacienta i přesto, že se nepodařilo přesně určit, zda jeho smrt ovlivnilo podání FTY720. US Food and drug Administration upravila doporučení a při používání FTY720 při léčbě sklerózy je nutné nepřetržité sledování pacienta nejlépe 12-20 hodin po podání první dávky (Allende et al., 2004). Viz obr. 14



Obr. 14 FTY720 a FTY720 v jeho fosforylované formě (Huwiler and Pfeilschifter, 2008)

SEW2871

SEW2871 je dalším z řady S1P agonistů, který aktivuje receptor S1P₁ a má stejný protektivní účinek jako S1P (Zhang et al., 2007). Jeho aplikování před nebo ihned po ischemii vede k ochraně buněk před I/R poškozením. To bylo potvrzeno na pokusech s I/R poškozením v ledvinové tkáni. Stejně tak jako FTY720 způsobuje nízkou koncentraci lymfocytů v krvi (Wei et al., 2005). Díky své schopnosti snižovat koncentraci lymfocytů napomáhá při zánětech tlustého střeva. Pravděpodobně by mohl hrát klíčovou roli v léčbě Cronovy choroby (Hofmann et al., 2009). Viz obr. 15



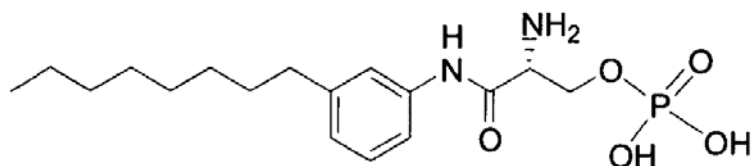
Obr. 15 SEW2871 (Huwiler and Pfeilschifter, 2008)

7.2. Antagonisté sfingosin-1-fosfátu

VPC23019

VPC23019 se řadí k neselektivním antagonistům receptory S1P₁ a S1P₃. V případě jeho navázání na jeden z těchto receptorů dochází k redukci protektivního účinku IPC a IPOST na rozsah infarktu a obnovu hemodynamické funkce v myších srdcích (Vessey et al.,

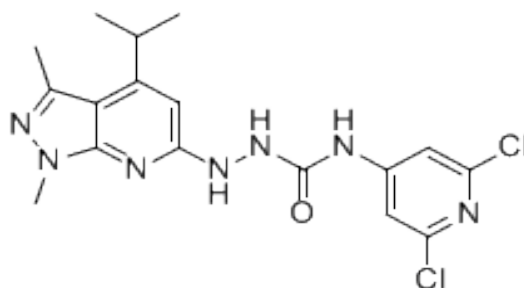
2009). Je schopen inhibovat agonisticky indukovanou buněčnou migraci při rakovině štítné žlázy a močových cest. Stejným způsobem ovlivňuje i migraci T-lymfocytů. Obrací SEW2871 stimulovanou migraci lymfoidních buněk do lymfoidních orgánů (Raje et al., 2012b). Viz obr. 16



Obr. 16 VPC23019 (Huwiler and Pfeilschifter, 2008)

JTE 013

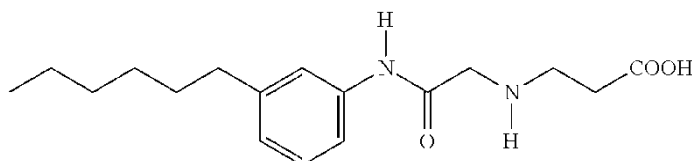
JTE 013 je antagonist receptoru S1P₂. Kooperace s jinými podtypy receptoru nejsou známy (Osada et al., 2002). Zvyšuje migraci endoteliální buněk, buněk hladkého svalstva a gliomových buněk, což může být chápáno jako negativní efekt. Na druhou stranu byly zjištěny jeho vasodilatační účinky, tato regulační schopnost může hrát důležitou roli v ochraně před vysokým tlakem (Allende et al., 2004). Viz obr. 17



Obr. 17 JTE 013 (Huwiler and Pfeilschifter, 2008)

W123

W123 má shodné účinky jako VPC23019. Způsobuje obrat agonisticky aktivované migrace T buněk. Tento jev byl pozorován pouze u receptoru 1, na ostatních receptorech zatím nebyl prozkoumán (Wei et al., 2005). Viz obr. 18



Obr. 18 W123 (Huwiler and Pfeilschifter, 2008)

V současné době probíhá nepřeborné množství pokusů a objevů nových sloučenin. Jen čas a další testování prověří, zda jsou tyto předpoklady správné a zda se některé sloučeniny budou moci v budoucnosti zařadit ke schváleným léčivům.

8. Závěr

Celá skupina sfingolipidů je naplněna nepřeborným množstvím látek s různými, někdy i naprosto odlišnými účinky. Jsou to ale právě tyto proti sobě působící vlastnosti, které mohou řídit osud samotné buňky. Zda dojde k podpoře jejího růstu nebo zda to povede k jejímu zániku. Rozhodujícím faktorem je právě hladina nebo poměr koncentrací zástupců sfingolipidů jako jsou například sfingosin, S1P nebo ceramid.

S1P potvrdil své kladné účinky právě na poli kardioprotekce. Zvýšení jeho koncentrace při vystavení buněk nedostatku kyslíku vede ke zvýšení jejich přežívání až o desítky procent. Pokusy byly nejprve provedeny na izolovaných kardiomyocytech a následně i na myších srdcích. S1P vzniká na základě reakce katalyzované SK. Ty se vyskytují ve dvou izoformách s odlišnými vlastnostmi. Přestože se zpočátku předpokládalo, že do kardioprotektivního účinku S1P větší měrou zasahuje pouze SK 1, opak byl pravdou. Při pokusech provedených na geneticky modifikovaných myších, kde došlo k delecii nebo KO genů pro jednu ze sfingosinkináz, vyšlo najevo, že jsou potřeba obě izoformy. Je to sice SK 1, která indukuje vznik S1P, který zahajuje onu kardioprotektivní odpověď, ovšem nedílnou součástí je i SK 2, která udržuje dostatečně vysokou hladinu S1P v buňce právě proto, aby ho bylo dostatek.

Ke zvýšené koncentraci S1P dochází díky procesům IPC a IPOST, které se skládají z krátkých period ischemie před nebo po hlavní ischemii. Tím se zvýší hladina S1P, který vzniká na plazmatické membráně. Odkud může ovlivnit osud buňky intracelulárně nebo extracelulárně. Extracelulární působení vede přes receptory. Tyto receptory S1P se nacházejí na membráně a jsou spřažené s G-proteiny. Při interakci s S1P vzniká signál vedoucí přes další zprostředkovatele až ke kardioprotekci. Tento sled událostí vede k ochraně a zvýšení přežívání buněk srdeční tkáně v případě, že je vystavena ischemii a došlo by k poranění a následnému rozsáhlému infarktu a apoptóze jejích buněk.

V klinické praxi dochází k rozvoji prakticky neustále. První sloučeninou, která byla schválena jako lék, se stal Fingolimod. Slibný výzkum ovšem naznačuje, že rozhodně nebyl poslední. Doufejme, že se k němu v blízké době připojí i další. Některé nově objevené sloučeniny poslouží jako mezikroky k vývoji dalších léčiv. V budoucnu budou

pravděpodobně agonisté S1P se svými kladně ovlivňující účinky využity nejen na poli kardiovaskulárních chorob, ale také například při léčbě rakovinných onemocnění.

9. Použitá literatura

- Allende, M.L., Sasaki, T., Kawai, H., Olivera, A., Mi, Y., Echten-Deckert, G. van, Hajdu, R., Rosenbach, M., Keohane, C.A., Mandala, S., Spiegel, S., Proia, R.L., 2004. Mice Deficient in Sphingosine Kinase 1 Are Rendered Lymphopenic by FTY720. *J. Biol. Chem.* 279, 52487–52492. doi:10.1074/jbc.M406512200
- Arana, L., Gangoiti, P., Ouro, A., Trueba, M., Gómez-Muñoz, A., 2010. Ceramide and ceramide 1-phosphate in health and disease. *Lipids Health Dis.* 9, 15. doi:10.1186/1476-511X-9-15
- Bandhuvula, P., Honbo, N., Wang, G.-Y., Jin, Z.-Q., Fyrst, H., Zhang, M., Borowsky, A.D., Dillard, L., Karliner, J.S., Saba, J.D., 2011. S1P lyase: a novel therapeutic target for ischemia-reperfusion injury of the heart. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 300, H1753–1761. doi:10.1152/ajpheart.00946.2010
- Cannon, R.O., 2005. Mechanisms, management and future directions for reperfusion injury after acute myocardial infarction. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 2, 88–94. doi:10.1038/ncpcardio0096
- Gault, C.R., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., 2010. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* 688, 1–23.
- Halestrap, A.P., Clarke, S.J., Khaliulin, I., 2007. The role of mitochondria in protection of the heart by preconditioning. *Biochim. Biophys. Acta* 1767, 1007–1031. doi:10.1016/j.bbambio.2007.05.008
- Hannun, Y.A., Bell, R.M., 1989. Functions of sphingolipids and sphingolipid breakdown products in cellular regulation. *Science* 243, 500–507.
- Hofmann, U., Burkard, N., Vogt, C., Thoma, A., Frantz, S., Ertl, G., Ritter, O., Bonz, A., 2009. Protective effects of sphingosine-1-phosphate receptor agonist treatment after myocardial ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc. Res.* 83, 285–293. doi:10.1093/cvr/cvp137
- Huwiler, A., Pfeilschifter, J., 2008. New players on the center stage: sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets. *Biochem. Pharmacol.* 75, 1893–1900. doi:10.1016/j.bcp.2007.12.018
- Huwiler, A., Zangemeister-Wittke, U., 2007. Targeting the conversion of ceramide to sphingosine 1-phosphate as a novel strategy for cancer therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 63, 150–159. doi:10.1016/j.critrevonc.2007.04.010
- Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S., Nakamura, S., 2003. Sphingosine Kinase 2 Is a Nuclear Protein and Inhibits DNA Synthesis. *J. Biol. Chem.* 278, 46832–46839. doi:10.1074/jbc.M306577200
- Igarashi, Y., Kitamura, K., Toyokuni, T., Dean, B., Fenderson, B., Ogawass, T., Hakomori, S., 1990. A specific enhancing effect of N,N-dimethylsphingosine on epidermal growth factor receptor autophosphorylation. Demonstration of its endogenous occurrence (and the virtual absence of unsubstituted sphingosine) in human epidermoid carcinoma A431 cells. *J. Biol. Chem.* 265, 5385–5389.
- Jin, Z.-Q., Goetzl, E.J., Karliner, J.S., 2004. Sphingosine Kinase Activation Mediates Ischemic Preconditioning in Murine Heart. *Circulation* 110, 1980–1989. doi:10.1161/01.CIR.0000143632.06471.93
- Jin, Z.-Q., Karliner, J.S., 2006. Low dose N, N-dimethylsphingosine is cardioprotective and activates cytosolic sphingosine kinase by a PKCepsilon dependent mechanism. *Cardiovasc. Res.* 71, 725–734. doi:10.1016/j.cardiores.2006.06.010
- Jin, Z.-Q., Karliner, J.S., Vessey, D.A., 2008. Ischaemic postconditioning protects isolated mouse hearts against ischaemia/reperfusion injury via sphingosine kinase isoform-1 activation. *Cardiovasc. Res.* 79, 134–140. doi:10.1093/cvr/cvn065
- Jin, Z.-Q., Zhou, H.-Z., Zhu, P., Honbo, N., Mochly-Rosen, D., Messing, R.O., Goetzl, E.J., Karliner, J.S., Gray, M.O., 2002. Cardioprotection mediated by sphingosine-1-phosphate and ganglioside GM-1 in wild-type and PKC epsilon knockout mouse hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 282, H1970–1977. doi:10.1152/ajpheart.01029.2001
- Johnson, K.R., Becker, K.P., Facchinetti, M.M., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., 2002. PKC-dependent activation of sphingosine kinase 1 and translocation to the plasma membrane. Extracellular release of sphingosine-1-phosphate induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA). *J. Biol. Chem.* 277, 35257–35262. doi:10.1074/jbc.M203033200

- Jo, S.-K., Bajwa, A., Ye, H., Vergis, A.L., Awad, A.S., Kharel, Y., Lynch, K.R., Okusa, M.D., 2009. Divergent roles of sphingosine kinases in kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int.* 75, 167–175. doi:10.1038/ki.2008.400
- Kennedy, S., Kane, K.A., Pyne, N.J., Pyne, S., 2009. Targeting sphingosine-1-phosphate signalling for cardioprotection. *Curr. Opin. Pharmacol., Cardiovascular and renal* 9, 194–201. doi:10.1016/j.coph.2008.11.002
- Kimura, T., Sato, K., Kuwabara, A., Tomura, H., Ishiwara, M., Kobayashi, I., Ui, M., Okajima, F., 2001. Sphingosine 1-phosphate may be a major component of plasma lipoproteins responsible for the cytoprotective actions in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 276, 31780–31785. doi:10.1074/jbc.M104353200
- *Knapp, M., 2011. Cardioprotective role of sphingosine-1-phosphate. *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* 62, 601–607.
- Kohama, T., Olivera, A., Edsall, L., Nagiec, M.M., Dickson, R., Spiegel, S., 1998. Molecular Cloning and Functional Characterization of Murine Sphingosine Kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 23722–23728. doi:10.1074/jbc.273.37.23722
- Liu, H., Toman, R.E., Goparaju, S.K., Maceyka, M., Nava, V.E., Sankala, H., Payne, S.G., Bektas, M., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S., Spiegel, S., 2003. Sphingosine Kinase Type 2 Is a Putative BH3-only Protein That Induces Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 40330–40336. doi:10.1074/jbc.M304455200
- Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C.-X., Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Nava, V.E., Chae, S.-S., Lee, M.-J., Liu, C.H., Hla, T., Spiegel, S., Proia, R.L., 2000. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* 106, 951–961. doi:10.1172/JCI10905
- Maceyka, M., Payne, S.G., Milstien, S., Spiegel, S., 2002. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim. Biophys. Acta* 1585, 193–201.
- Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N.C., Stunff, H.L., Liu, H., Toman, R., Collier, C., Zhang, M., Satin, L.S., Merrill, A.H., Milstien, S., Spiegel, S., 2005. SphK1 and SphK2, Sphingosine Kinase Isoenzymes with Opposing Functions in Sphingolipid Metabolism. *J. Biol. Chem.* 280, 37118–37129. doi:10.1074/jbc.M502207200
- Nakade, Y., Banno, Y., T-Koizumi, K., Hagiwara, K., Sobue, S., Koda, M., Suzuki, M., Kojima, T., Takagi, A., Asano, H., Nozawa, Y., Murate, T., 2003. Regulation of sphingosine kinase 1 gene expression by protein kinase C in a human leukemia cell line, MEG-O1. *Biochim. Biophys. Acta* 1635, 104–116.
- Nikolova-Karakashian, M.N., Reid, M.B., 2011. Sphingolipid metabolism, oxidant signaling, and contractile function of skeletal muscle. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 2501–2517. doi:10.1089/ars.2011.3940
- Osada, M., Yatomi, Y., Ohmori, T., Ikeda, H., Ozaki, Y., 2002. Enhancement of sphingosine 1-phosphate-induced migration of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by an EDG-5 antagonist. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 483–487.
- Pyne, S., Pyne, N.J., 2000. Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem. J.* 349, 385–402.
- Raje, M.R., Knott, K., Kharel, Y., Bissel, P., Lynch, K.R., Santos, W.L., 2012a. Design, synthesis and biological activity of sphingosine kinase 2 selective inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 183–194. doi:10.1016/j.bmc.2011.11.011
- Raje, M.R., Knott, K., Kharel, Y., Bissel, P., Lynch, K.R., Santos, W.L., 2012b. Design, synthesis and biological activity of sphingosine kinase 2 selective inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 183–194. doi:10.1016/j.bmc.2011.11.011
- Riboni, L., Viani, P., Bassi, R., Prinetti, A., Tettamanti, G., 1997. The role of sphingolipids in the process of signal transduction. *Prog. Lipid Res.* 36, 153–195.
- Rosen, H., Sanna, M.G., Cahalan, S.M., Gonzalez-Cabrera, P.J., 2007. Tipping the gatekeeper: S1P regulation of endothelial barrier function. *Trends Immunol.* 28, 102–107. doi:10.1016/j.it.2007.01.007
- Sanna, M.G., Liao, J., Jo, E., Alfonso, C., Ahn, M.-Y., Peterson, M.S., Webb, B., Lefebvre, S., Chun, J., Gray, N., Rosen, H., 2004. Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P1 and

- S1P3, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J. Biol. Chem.* 279, 13839–13848. doi:10.1074/jbc.M311743200
- Sattler, K., Levkau, B., 2009. Sphingosine-1-phosphate as a mediator of high-density lipoprotein effects in cardiovascular protection. *Cardiovasc. Res.* 82, 201–211. doi:10.1093/cvr/cvp070
- Singleton, P.A., Dudek, S.M., Chiang, E.T., Garcia, J.G.N., 2005. Regulation of sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cytoskeletal rearrangement and barrier enhancement by S1P1 receptor, PI3 kinase, Tiam1/Rac1, and alpha-actinin. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 19, 1646–1656. doi:10.1096/fj.05-3928com
- Spiegel, S., Milstien, S., 2003. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 397–407. doi:10.1038/nrm1103
- Strub, G.M., Maceyka, M., Hait, N.C., Milstien, S., Spiegel, S., 2010. Extracellular and Intracellular Actions of Sphingosine-1-Phosphate. *Adv. Exp. Med. Biol.* 688, 141–155.
- Takabe, K., Paugh, S.W., Milstien, S., Spiegel, S., 2008. “Inside-out” signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* 60, 181–195. doi:10.1124/pr.107.07113
- Theilmeyer, G., Schmidt, C., Herrmann, J., Keul, P., Schäfers, M., Herrgott, I., Mersmann, J., Larmann, J., Hermann, S., Stypmann, J., Schober, O., Hildebrand, R., Schulz, R., Heusch, G., Haude, M., von Wnuck Lipinski, K., Herzog, C., Schmitz, M., Erbel, R., Chun, J., Levkau, B., 2006. High-density lipoproteins and their constituent, sphingosine-1-phosphate, directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury in vivo via the S1P3 lysophospholipid receptor. *Circulation* 114, 1403–1409. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.607135
- Vessey, D.A., Li, L., Honbo, N., Karliner, J.S., 2009. Sphingosine 1-phosphate is an important endogenous cardioprotectant released by ischemic pre- and postconditioning. *Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol.* 297, H1429–H1435. doi:10.1152/ajpheart.00358.2009
- Vessey, D.A., Li, L., Imhof, I., Honbo, N., Karliner, J.S., 2013. FTY720 postconditions isolated perfused heart by a mechanism independent of sphingosine kinase 2 and different from S1P or ischemic postconditioning. *Med. Sci. Monit. Basic Res.* 19, 126–132. doi:10.12659/MSMBR.883877
- Vessey, D.A., Li, L., Jin, Z.-Q., Kelley, M., Honbo, N., Zhang, J., Karliner, J.S., 2011. A Sphingosine Kinase Form 2 Knockout Sensitizes Mouse Myocardium to Ischemia/Reoxygenation Injury and Diminishes Responsiveness to Ischemic Preconditioning. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2011, e961059. doi:10.1155/2011/961059
- Vessey, D.A., Li, L., Kelley, M., Karliner, J.S., 2008a. Combined sphingosine, S1P and ischemic postconditioning rescue the heart after protracted ischemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375, 425–429. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.022
- Vessey, D.A., Li, L., Kelley, M., Zhang, J., Karliner, J.S., 2008b. Sphingosine can pre- and post-condition heart and utilizes a different mechanism from sphingosine 1-phosphate. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 22, 113–118. doi:10.1002/jbt.20227
- Wei, S.H., Rosen, H., Matheu, M.P., Sanna, M.G., Wang, S.-K., Jo, E., Wong, C.-H., Parker, I., Cahalan, M.D., 2005. Sphingosine 1-phosphate type 1 receptor agonism inhibits transendothelial migration of medullary T cells to lymphatic sinuses. *Nat. Immunol.* 6, 1228–1235. doi:10.1038/ni1269
- Yatomi, Y., Ozaki, Y., Ohmori, T., Igarashi, Y., 2001. Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 64, 107–122.
- Zhang, J., Honbo, N., Goetzl, E.J., Chatterjee, K., Karliner, J.S., Gray, M.O., 2007. Signals from type 1 sphingosine 1-phosphate receptors enhance adult mouse cardiac myocyte survival during hypoxia. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, H3150–3158. doi:10.1152/ajpheart.00587.2006
- Zhao, Z.-Q., Corvera, J.S., Halkos, M.E., Kerendi, F., Wang, N.-P., Guyton, R.A., Vinten-Johansen, J., 2003. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285, H579–588. doi:10.1152/ajpheart.01064.2002
- Ceramid, In: Blexon, University of Zurich, Department of biochemistry, 2009
Dostupné z : <http://www.bioc.uzh.ch/blexon/c:ceramid>
- Sfingosin, In: Moje chemie, 2010
Dostupné z : <http://www.mojechemie.cz/Biochemie:Lipidy>

Sfingosin-1-fosfát, In: Chemical book, 2010

Dostupné z : http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB4181497.htm

Sfingosin a ceramid

Dostupné z : http://orion.chemi.muni.cz/zakladni_pojmy_z_biochemie/page0332.htm

Converging roles for sphingolipids and cell stress in progression of neuro-AIDS.

In: Frontiers in Bioscience. Norman J. Haughey et al. Mai 1, 2008.

Dostupné z : <https://www.bioscience.org/2008/v13/af/3068/fulltext.php?bframe=viewer.htm>

Synthesis of sphingosine and the ceramides. In: Medical biochemistry page.

Michael W King, PhD |© 1996–2014 themedicalbiochemistrypage.org.

Dostupné z : <http://themedicalbiochemistrypage.org/sphingolipids.php>

Ceramid-1-fosfát, In: Chemical Book, 2010

Dostupné z: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB61176180.htm